

(19)



Europäisches Patentamt

European Patent Office

Office européen des brevets



(11)

EP 0 694 258 A2

(12)

EUROPÄISCHE PATENTANMELDUNG

(43) Veröffentlichungstag:
31.01.1996 Patentblatt 1996/05

(51) Int. Cl.⁶: **A01N 43/40**, A01N 43/80
// (A01N43/40, 43:80, 43:32,
35:08)

(21) Anmeldenummer: **95109942.3**

(22) Anmeldetag: **26.06.1995**

(84) Benannte Vertragsstaaten:
AT BE CH DE ES FR GB IT LI

(30) Priorität: **27.06.1994 DE 4422374**

(71) Anmelder: **BOEHRINGER MANNHEIM GMBH**
D-68305 Mannheim-Waldhof (DE)

(72) Erfinder:
• **Kurrle-Weittenhiller, Angelika, Dr.**
D-82327 Tutzing (DE)
• **Schmidt, Axel, Dr.**
D-80634 München (DE)

(74) Vertreter: **Böhm, Brigitte, Dipl.-Chem., Dr. et al**
D-81635 München (DE)

(54) **Konservierungsmittelmischung für diagnostische Testflüssigkeiten**

(57) Eine Konservierungsmittelmischung, insbesondere für die Konservierung von diagnostischen Testflüssigkeiten, enthält das Natriumsalz von Mercaptopyridin-N-oxid zusammen mit einer weiteren konservierenden Substanz. Ein erfindungsgemäßer diagnostischer Testkit enthält als Konservierungsmittel einer oder mehrerer Testflüssigkeiten des Testkits Mercaptopyridin-N-oxid-Natriumsalz, eine Verbindung aus der Gruppe der Isothiazolone und insbesondere 2-Alkyl-3-(2H)-isothiazolon-hydrochlorid mit 1 bis 8 C-Atomen in der 2-Alkylgruppe oder eine erfindungsgemäße Konservierungsmittelmischung.

EP 0 694 258 A2

Beschreibung

Die vorliegende Erfindung betrifft Konservierungsmittelmischungen, die Verwendung bestimmter Konservierungsmittel oder Konservierungsmittelmischungen in Testflüssigkeiten diagnostischer Testkits sowie diagnostische Testkits, bei denen eine oder mehrere Testflüssigkeiten mit einem erfindungsgemäßen Konservierungsmittel stabilisiert sind.

Geeignete Konservierungsmittel für diagnostische Testkits sind nicht leicht zu finden, da oft eine Beeinträchtigung der Bestimmung der nachzuweisenden oder zu quantifizierenden Substanz durch das Konservierungsmittel auftritt oder zu befürchten ist. Ein weiteres Problem liegt in der geringen Löslichkeit der Konservierungsmittel, welche auch nicht für alle der bisher bekannten Konservierungsmittel ausreichend ist, um einen Einsatz in diagnostischen Testkits zu erlauben. Schließlich haben sich viele der bisher bekannten Konservierungsmittelsubstanzen als ungeeignet erwiesen, da eine Eintrübung des Reagenz, eine gestörte Wiederfindung in Proben, Hämoglobinstörung bei blutenthaltenden Proben, ungenügende mikrobiologische Wirksamkeit, Instabilität des Reagenz bei Belastung und weitere Nachteile beobachtet wurden. Aus diesem Grunde wurde in diagnostischen Tests bevorzugt Natriumazid verwendet, welches bisher zumindest die geringsten Störungen der Tests, insbesondere von α -Amylasetests, zeigte.

Die Verwendung von Natriumazid bietet jedoch immer mehr Probleme. Ganz generell wird heute versucht, die Verwendung von derart giftigen Substanzen zu vermeiden, insbesondere da es sich bei Natriumazid um einen mutagenen, potentiell karzinogenen und cytotoxischen Stoff handelt, der darüber hinaus noch explosive Schwermetallazide bei der Lagerung bilden kann. Im übrigen ist die konservierende Wirkung von Natriumazid manchmal problematisch, da Resistenzen zunehmen und das Wirkungsspektrum nicht sehr breit ist. Insbesondere bei Durchführung eines Amylasetests tritt darüber hinaus eine Hämoglobinstörung auf, welche durch Komplexbildung von Hämoglobin mit Azid hervorgerufen wird. Diese Hämoglobinstörung konnte nur durch den Zusatz einer Entstörschubstanz teilweise behoben werden, was jedoch ebenfalls einen Nachteil darstellt, da wiederum eine weitere Substanz zugeführt wird, die selbst u.a. Störungen hervorrufen kann.

Aufgabe der vorliegenden Erfindung war es daher, eine Konservierung bereitzustellen, welche insbesondere in diagnostischen Tests eingesetzt werden kann unter größtmöglicher Vermeidung von Störungen bei der Testdurchführung.

Erfindungsgemäß wird dies erreicht durch eine Konservierungsmittelmischung, insbesondere für die Konservierung von diagnostischen Testflüssigkeiten, welche das Natriumsalz von Mercaptopyridin-N-oxid zusammen mit einem 2-Alkyl-3-(2H)-isothiazolon-hydrochlorid, dessen 2-Alkyl-Gruppierung ein bis acht Kohlenstoffatome umfaßt oder einem 2-Brom-2-nitropropandiol-1,3-Derivat enthält.

Überraschenderweise hat man festgestellt, daß das Natriumsalz von Mercaptopyridin-N-oxid die diagnostische Bestimmung bestimmter Substanzen in Testflüssigkeiten, und insbesondere von α -Amylase in Körperflüssigkeiten nicht oder nur in vernachlässigbarer Weise beeinträchtigt. Mercaptopyridin-N-oxid-Natriumsalz stellt außerdem eine Verbindung dar, die für höhere Organismen nur wenig giftig ist und keinerlei Probleme bei der Handhabung verursacht.

Bei der Bestimmung von α -Amylase unter Verwendung der erfindungsgemäßen Konservierungsmittelmischung hat sich herausgestellt, daß die Qualität der im Test verwendeten α -Glucosidase eine Rolle spielt. Als besonders geeignet hat sich eine α -Glucosidase aus einem thermostabilen Mikroorganismus erwiesen.

Durch Einsatz von zwei Konservierungsmitteln in der erfindungsgemäßen Konservierungsmittelmischung, also dem Mercaptopyridin-N-oxid und einer der weiteren genannten konservierenden Substanzen, bietet sich der weitere Vorteil, daß Resistenzentwicklungen verhindert werden und daß man im allgemeinen auch mit geringeren Mengen der jeweiligen Substanzen auskommen kann.

Als weitere konservierende Substanz wird als eine Ausführungsform der vorliegenden Erfindung eine Verbindung aus der Gruppe der Isothiazolone eingesetzt. Hierbei sind 2-Alkyl-3-(2H)-isothiazolon-hydrochloride bevorzugt, die in der 2-Alkyl-Gruppierung 1 bis 8 Kohlenstoffatome enthalten. Eine besonders bevorzugte Verbindung ist das 2-Methyl-3-(2H)-isothiazolon-hydrochlorid (MIT) oder aber auch das 2-Methyl-4,5-trimethylen-4-isothiazolin-on.

Insbesondere mit einer dieser bevorzugten Konservierungsmittelmischung wird im Fall eines diagnostischen Amylasetests eine sehr viel geringere Hämoglobinstörung beobachtet als bei Verwendung von Natriumazid.

In einer alternativen Ausführungsform der Erfindung wird als zweite konservierende Substanz ein 2-Brom-2-nitropropandiol-1,3-Derivat und besonders bevorzugt Bromnitrodioxan verwendet. Auch bei dieser erfindungsgemäß bevorzugten Kombination tritt nur eine geringe Hämoglobinstörung bei Amylasetests auf, weshalb auch hier ohne weitere Entstörsmaßnahmen der Test durchführbar ist.

Die einzelnen Substanzen der Konservierungsmittelmischung sind in solchen Mengen vorhanden, daß sie in der zu konservierenden Testflüssigkeit vorzugsweise in folgenden Konzentrationen vorliegen:

Mercaptopyridin-N-oxid-Natriumsalz:

0,005 bis 0,1 % und besonders bevorzugt 0,08 bis 0,012 %;

Isothiazolon-Verbindung 0,005 bis 0,1 % und besonders bevorzugt 0,015 bis 0,025 % sowie

Bromnitrodioxan 0,005 bis 0,1 % und besonders bevorzugt 0,015 bis 0,025 %.

Die erfindungsgemäße Konservierungsmittelmischung weist also Vorteile dahingehend auf, daß sie nur geringste Störungen bei diagnostischen Tests verursacht und daher ohne weitere Entstörsmaßnahmen eingesetzt werden

kann, um die Flüssigkeiten in diagnostischen Testkits zu konservieren. Sie enthält darüber hinaus keine aufgrund ihrer Toxizität problematischen Verbindungen und durch die Kombination mindestens zweier konservierender Stoffe werden Resistenzbildungen verhindert und man kommt auch mit verhältnismäßig geringen Mengen der einzelnen Substanzen aus.

5 Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist die Verwendung von Mercaptopyridin-N-oxid-Natriumsalz gegebenenfalls zusammen mit einer weiteren konservierenden Substanz zur Konservierung von Testflüssigkeiten diagnostischer Testkits. Insbesondere findet dieser Gegenstand der Erfindung Anwendung in einem Amylasetestkit.

10 Im Rahmen der Erfindung bevorzugte weitere konservierende Substanzen sind solche aus der Gruppe der Isothiazolone, bevorzugt 2-Alkyl-3-(2H)isothiazolonhydrochlorid, dessen 2-Alkyl-Gruppierung ein bis acht Kohlenstoffatome umfaßt und insbesondere 2-Methyl-3-(2H)-isothiazolonhydrochlorid (MIT), oder aber auch 2-Methyl-4,5-trimethylen-4-isothiazolon, sowie Verbindungen aus der Gruppe der 2-Brom-2-nitropropandiol-1,3-Derivate, wie insbesondere Bromnitrodioxan. Weitere zusammen mit Mercaptopyridin-N-oxid einsetzbare konservierende Verbindungen auszuwählen, liegt im Rahmen des Könnens des Fachmanns, wobei die Mischung so vorzunehmen ist, daß der ins Auge gefaßte Test nicht gestört wird.

15 Für die Anwendung in diagnostischen Testkits und insbesondere für die Anwendung in einem Amylasetest ist jedoch auch zur Konservierung eine Verbindung aus der Gruppe der Isothiazolone und insbesondere 2-Alkyl-3-(2H)-isothiazolonhydrochloride mit 1 bis 8 C-Atomen in der 2-Alkylgruppe besonders geeignet, weshalb auch deren entsprechende Verwendung einen weiteren Gegenstand der vorliegenden Erfindung darstellt. Ganz besonders bevorzugt werden 2-Methyl-3-(2H)-isothiazolonhydrochlorid (MIT) oder 2-Methyl-4,5-trimethylen-4-isothiazolin-on als Verbindungen der
20 Gruppe der Isothiazolone verwendet.

Weitere Gegenstände der vorliegenden Erfindung sind diagnostische Testkits, die als Konservierungsmittel einer oder mehrerer Testflüssigkeiten des Testkits Mercaptopyridin-N-oxid-Natriumsalz oder eine Verbindung der Gruppe der Isothiazolone enthalten. Besonders bevorzugt sind hierbei 2-Methyl-4,5-trimethylen-4-isothiazolin-on bzw. 2-Alkyl-3-(2H)-isothiazolonhydrochloride mit 1 bis 8 C-Atomen in der 2-Alkylgruppe und insbesondere 2-Methyl-3-(2H)-isothiazolonhydrochlorid (MIT). Mercaptopyridin-N-oxid kann dabei auch in Verbindung mit einem Isothiazolon oder einem 2-Brom-2-nitropropandiol-1,3-Derivat, wie insbesondere Bromnitrodioxan, vorliegen.
25

Solche diagnostischen Testkits stellen wiederum einen weiteren Gegenstand der vorliegenden Erfindung dar. Besonders bevorzugt handelt es sich bei dem erfindungsgemäßen diagnostischen Testkit, der mit Hilfe der erfindungsgemäßen Konservierungsmittelmischung bzw. der genannten Einzelverbindungen konserviert wird, um einen Testkit zur Bestimmung der α -Amylase. Andere Testkits unter Einsatz von Testflüssigkeiten, welche bereits in der Testpackung in flüssiger Form vorliegen und über längere Zeit stabilisiert werden müssen, sind jedoch auch im Rahmen der Erfindung geeignet. Die erfindungsgemäße Konservierungsmittelmischung findet in allen derartigen diagnostischen Testkits Anwendung und führt zu den bereits oben genannten Vorteilen gegenüber bisher bekannten Konservierungsmitteln oder Methoden zur Konservierung von Flüssigkeiten.
30

35 Die vorliegende Erfindung soll durch die folgenden Beispiele weiter erläutert werden.

40

45

50

55

Beispiel 1

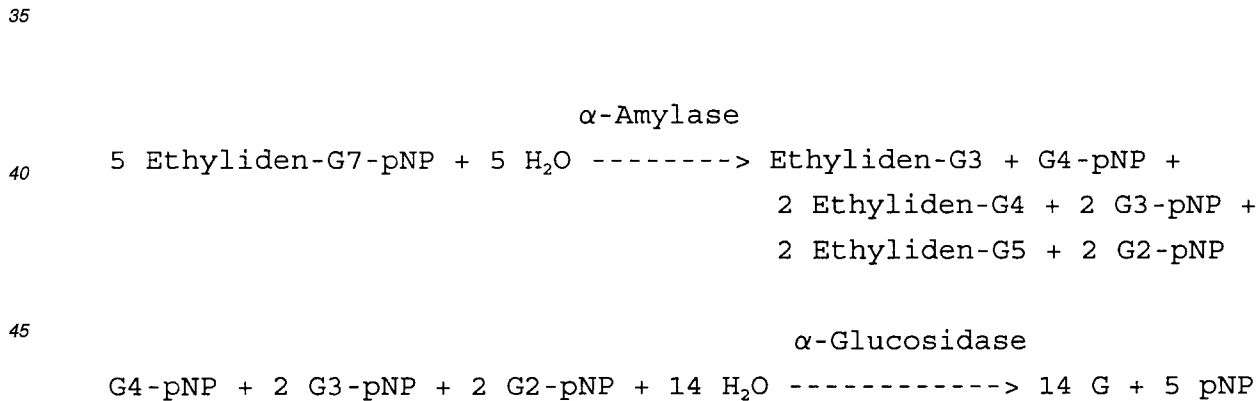
Lösungen für die diagnostische Bestimmung von α -Amylase

5	Reagenz 1:	α -Glucosidase multifunktionell: (Fa. Toyobo, Japan)	8 U/ml
		HEPES-Puffer:	105 mmol/l
10		NaCl:	pH 7,1
		MgCl ₂ :	52 mmol/l
		MIT oder Bromnitrodioxan	10,5 mmol/l
15		Mercaptopyridin-N-oxid, Na-Salz:	0,02 %
	Reagenz 2:	4,6-Ethyliden-G7-pNP:	0,01 %
		HEPES-Puffer:	20 mmol/l
20		NaCl:	105 mmol/l
		MgCl ₂ :	pH 7,1
		MIT oder Bromnitrodioxan:	52 mmol/l
25		Mercaptopyridin-N-oxid, Na-Salz:	10,5 mmol/l
			0,02 %
			0,01 %

30 Beispiel 2

Durchführung der Bestimmung der Menge von α -Amylase (total und Pankreas- α -Amylase)

Testprinzip



50 (G = Glucose, pNP = para-Nitrophenol)

Pankreasamylase:

55 Durch spezifische Antikörper wird die Speichel- α -Amylase gehemmt, so daß nur die Pankreas- α -Amylase an der oben beschriebenen Reaktion teilnimmt.

Kalibration: Std. 1 = 0,9 % NaCl, Std. 2 = Cfas
Qualitätskontrolle: PNU, PPU, PNE, PPE
Probenmaterial: Serum, EDTA-Plasma, Heparin-Plasma, Urin

EP 0 694 258 A2

Verdünnungsgrenze: 2000 U/l

Reagenzien: **T- α -Amylase:** Lösung 1: Enzymlösung, gebrauchsfertig
 Lösung 2: Substratlösung, gebrauchsfertig
P- α -Amylase: Lösung 1: Enzym-Antikörper-Lösung gebrauchsfertig
 Lösung 2: Substratlösung, gebrauchsfertig

Bestimmungsansatz: Wellenlänge: Hg 405 nm
 Küvette: 1 cm Schichtdicke
 Meßtemperatur: 37°C
 Messung gegen Luft (Extinktionszunahme)

In eine Küvette pipettieren

	Std. 1	Std. 2	Probe	Qk
Lösung 1	2,5 ml	2,5 ml	2,5 ml	2,5 ml
Meßtemperatur überprüfen				
NaCl	0,1 ml	-	-	-
CFas	-	0,1 ml	-	-
Serum/Plasmid/Urin	-	-	0,1 ml	-
PNU/PPU/PNE/PPE/	-	-	-	0,1 ml
Mischen, 5 min bei Meßtemperatur inkubieren				
Lösung 2	0,5 ml	0,5 ml	0,5 ml	0,5 ml
Mischen, bei Meßtemperatur inkubierten E1 nach genau 3 min ablesen, E2 nach genau 6 min ablesen $dE = E2 - E1$				

Patentansprüche

1. Konservierungsmittelmischung, insbesondere für die Konservierung von diagnostischen Testflüssigkeiten, **dadurch gekennzeichnet**, daß sie das Natriumsalz von Mercaptopyridin-N-oxid zusammen mit einem 2-Alkyl-3-(2H)isothiazolon-hydrochlorid, dessen 2-Alkyl-Gruppierung ein bis acht Kohlenstoffatome umfaßt, oder einem 2-Brom-2-nitropropandiol-1,3-Derivat enthält.
2. Konservierungsmittelmischung nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß sie Mercaptopyridin-N-oxid zusammen mit 2-Methyl-3-(2H)-isothiazolon-hydrochlorid (MIT), 2-Methyl-4,5-trimethylen-4-isothiazolin-on oder Bromnitrodioxan enthält.
3. Konservierungsmittelmischung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, **dadurch gekennzeichnet**, daß sie 0,005 bis 0,1 und besonders bevorzugt 0,008 bis 0,012 % Natriumsalz von Mercaptopyridin-N-oxid und 0,005 bis 0,1 % und bevorzugt 0,015 bis 0,025 % MIT bzw. 2-Methyl-4,5-trimethylen-4-isothiazolin-on, bzw. 0,005 bis 0,1 % und besonders bevorzugt 0,015 bis 0,025 % Bromnitrodioxan enthält.
4. Verwendung von Mercaptopyridin-N-oxid-Natriumsalz gegebenenfalls zusammen mit einer weiteren konservierenden Substanz zur Konservierung von Testflüssigkeiten diagnostischer Testkits und insbesondere von Testflüssigkeiten eines Amylasetestkits.
5. Verwendung nach Anspruch 4, **dadurch gekennzeichnet**, daß als weitere konservierende Substanz eine Verbindung aus der Gruppe der Isothiazolene und bevorzugt ein 2-

Alkyl-3-(2H)-isothiazolonhydrochlorid, dessen 2-Alkyl-Gruppierung ein bis acht C-Atome umfaßt, oder ein 2-Brom-2-nitropropandiol-1,3-Derivat eingesetzt wird.

- 5 6. Verwendung einer Verbindung aus der Gruppe der Isothiazolone und insbesondere eines 2-Alkyl-3-(2H)-isothiazolon-hydrochlorids mit 1 bis 8 C-Atomen in der 2-Alkylgruppe zur Konservierung von Testflüssigkeiten diagnostischer Testkits und insbesondere von Testflüssigkeiten eines Amylasetestkits.
- 10 7. Verwendung von 2-Methyl-4,5-trimethylen-4-isothiazolin-on zur Konservierung von Testflüssigkeiten diagnostischer Testkits und insbesondere von Testflüssigkeiten eines Amylasetestkits.
- 15 8. Diagnostischer Testkit,
dadurch gekennzeichnet,
daß er als Konservierungsmittel einer oder mehrerer Testflüssigkeiten des Testkits Mercaptopyridin-N-oxid-Natri-
umsalz gegebenenfalls zusammen mit einer weiteren konservierenden Substanz enthält.
- 20 9. Diagnostischer Testkit gemäß Anspruch 11,
dadurch gekennzeichnet,
daß er als weitere konservierende Substanz eine Verbindung aus der Gruppe der Isothiazolone und bevorzugt ein
2-Alkyl-3-(2H)-isothiazolonhydrochlorid, dessen 2-Alkyl-Gruppierung ein bis acht C-Atome umfaßt, oder ein 2-Brom-
2-Nitropropandiol-1,3-Derivat enthält.
- 25 10. Diagnostischer Testkit,
dadurch gekennzeichnet,
daß er als Konservierungsmittel einer oder mehrerer Testflüssigkeiten des Testkits eine Verbindung aus der Gruppe
der Isothiazolone, insbesondere 2-Alkyl-3-(2H)-isothiazolon-hydrochlorid mit 1 bis 8 C-Atomen in der 2-Alkylgruppe
und bevorzugt 2-Methyl-3-(2H)-isothiazolon-hydrochlorid (MIT), oder 2-Methyl-4,5-trimethylen-4-isothiazolin-on
enthält.